

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 21 JUN 1996

出願人又は代理人 の書類記号 C-853-PCT	今後の手続きについては、国際予備報告の送付通知(様式PCT/IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 95/02169	国際出願日 (日.月.年) 20.10.95	優先日 (日.月.年) 21.10.94
国際特許分類 (IPC) Int. cl <sup>6</sup> A61K39/395		
出願人 (氏名又は名称) 岸 本 忠 三		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で            ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.11.95	国際予備審査報告を作成した日 06.06.96	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 松 浦 新 司	4C 9454
電話番号 03-3581-1101 内線 3454		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1994年1月)



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                |   |       |        |                      |
|--------------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 | _____ | ページ、   | 出願時のもの               |
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 補正により、下記の書類が削除された。

- |                                |   |       |       |
|--------------------------------|---|-------|-------|
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 | _____ | ページ   |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項     |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 | _____ | ページ/図 |

3. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

4. 追加の意見(必要ならば)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-14	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-14	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-14	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

国際調査報告で引用された文献1(JP, 3-139293, A(岸本忠三), 13. 6月. 1991(13. 06. 91)), 特許請求の範囲及び第6頁右下欄第9行-第12行)には、モノクローナル抗体又はPM1抗体である抗-ヒトインターロイキン-6-レセプター抗体、及びこの抗体はIL-6の異常産生が病因因子であると考えられている種々の自己免疫疾患の治療薬としての応用開発も考えられることが記載されている。

文献2(JP, 3-157400, A(イェダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド), 5. 7月. 1991(05. 07. 91)), 特許請求の範囲及び第8頁右上欄第20行-左下欄第9行)には、IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rに対する抗体、及びこの抗体はモノクローナル抗体でもよいこと、これらは天然の抗体と同じ形か又はキメラ分子の形、又は抗体を治療に最も適した形にすることが記載されている。

文献3(JP, 3-155795, A(岸本忠三), 3. 7月. 1991(03. 07. 91)), 特許請求の範囲及び第3頁左下欄第11行-右下欄第4行)には、IL-6の作用を人為的に調節することは、各種疾患の新しい治療のメカニズムとして期待されること、各種自己免疫疾患では、その病因と考えられるIL-6作用の抑制が、症状の軽減につながり、そのためには、遺伝子工学的に作成されたヒトIL-6に対する中和抗体が考えられることが記載されている。

文献4(WO, 92/19759, A2(中外製薬株式会社), 12. 11月. 1992(12. 11. 92)), 特許請求の範囲第1頁第18行-第4頁第25行)には、ヒトIL-6-Rに対するキメラ抗体及び再構成ヒト抗体、そして再構成ヒト抗体は療法目的のために有用であると予測されることが記載されている。

したがって、請求の範囲1-14に記載された発明は、国際調査報告で引用された上記文献1-4の記載から、自明である。



## PCT

## TRANSLATION

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference C-853-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP 95/02169	International filing date (day/month/year) 20.10.95	Priority date (day/month/year) 21.10.94
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/395		
Applicant KISHIMOTO, Tadimitsu		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 30.11.95	Date of completion of this report 06.06.96
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/J P 95/02169

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description. pages \_\_\_\_\_ . as originally filed.  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_ . as originally filed.  
Nos. \_\_\_\_\_ . as amended under Article 19.  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .
- ☐ the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_ . as originally filed.  
sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .

## 2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

## 4. Additional observations, if necessary:



1

2

3

4

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 95/02169

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 14	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Document 1 (JP, 3-139293, A(KISHIMOTO, Chuzo), 13 June 1991(13.06.91) the claims and page 6, lower right column, lines 9-12, cited in the ISR, discloses human interleukin-6-receptor-antibody, which is monoclonal antibody or PM1 antibody, and that this antibody could be developed for remedy for diseases caused by abnormal production of IL-6.

Document 2 (JP, 3-157400, A(YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.) 5 July 1991(05.07.91), the claims and page 8, upper right column, lines 20 - lower left line 9), cited in the ISR, discloses an antibody against IFN/ $\beta$ 2/IL-6-R, which may be monoclonal antibody and that such an antibody can be in form of natural antibody or chimera antibody, or any other form suitable for treatment.

Document 3 (JP, 3-155795, A(KISHIMOTO, Chuzo), 13 July 1991(13.07.91) the claims and page 3, lower left column, lines 11 - lower right column, line 4, cited in the ISR, discloses that it is hoped artificial control of IL-6 action can be a new way of treatment for various diseases and that the control of IL-6 which is cause of disease can cure various diseases and for that purpose, neutralization



1

2

3

4

antibody could be considered to be used against human IL-6 produced by using genetic engineering technique

Document 4 (WO, 92/

19759, A2 (CHUGAI pharmaceutical CO., LTD.), 12 November 1992 (12.11.92) the claims, page 1, line 18 - page 4 line 25) discloses chimera antibody and recomposed human antibody against human IL-6R and that the recomposed human antibody is considered effective for treatment.

Subject matters of claims 1-14 are, therefore, obvious to a person skilled in the art from the disclosures of cited documents 1 -4.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02169

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 3-139293, A (Chuzo Kishimoto), June 13, 1991 (13. 06. 91), Claim, lines 9 to 12, lower right column, page 6 (Family: none)	1-11, 14
Y	JP, 3-157400, A (Yeda Research and Development Co., Ltd.), July 5, 1991 (05. 07. 91), Claim, line 20, upper right column to line 9, lower left column, page 8 & EP, 413908, A	1-10, 12
Y	JP, 3-155795, A (Chuzo Kishimoto), July 3, 1991 (03. 07. 91), Claim, line 11, lower left column to line 4, lower right column, page 3 (Family: none)	1 - 9
Y	WO, 92/19759, A2 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), November 12, 1992 (12. 11. 92), Claim, line 18, page 1 to line 25, page 4 & EP, 628639, A	1 - 10, 12 - 14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 6, 1995 (06. 12. 95)

Date of mailing of the international search report

January 16, 1996 (16. 01. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.







P.B. 5818 - Patentlaan 2  
2280 HV Rijswijk (ZH)  
☎ +31 70 340 2040  
TX 31651 epo nl  
FAX +31 70 340 3016

Europäisches  
Patentamt

Zweigstelle  
in Den Haag  
Recherchen-  
abteilung

European  
Patent Office

Branch at  
The Hague  
Search  
division

Office européen  
des brevets

Département à  
La Haye  
Division de la  
recherche

Lloyd, Patrick Alexander Desmond  
Reddie & Grose  
16 Theobalds Road  
London WC1X 8PL  
GRANDE BRETAGNE

*Heiter, to you know as?  
Hahn, Matt*

SEARCHED	INDEXED
SERIALIZED	FILED
JUL 31 2002	
THE HAGUE	

Datum/Date

29.07.02

Zeichen/Ref./Réf. <b>PADL/GJL/38604</b>	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°. <b>95934866.5-2402-JP9502169</b>
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire <b>Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha, et al</b>	

## COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

## REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.







DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
X,D	WO 92 19759 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 12 November 1992 (1992-11-12) * the whole document *	1-14	A61K39/395
X,P	& EP 0 628 639 A 14 December 1994 (1994-12-14) pages 4-5; examples 6,7,11 and 12; page 3, lines 20-22	1-14	
X	--- EP 0 409 607 A (KISHIMOTO TADAMITSU) 23 January 1991 (1991-01-23) column 1, lines 18-19; column 3, lines 9-20; column 6, lines 39-44; examples 4 and 5	1-11	
X	--- FR 2 694 767 A (INNOTHERAPIE LAB SA) 18 February 1994 (1994-02-18) page 3, lines 29-35; page 5, lines 18-28; examples 3 and 4; claims	1-10,12,13	
X	--- EP 0 413 908 A (YEDA RES & DEV) 27 February 1991 (1991-02-27) page 3, lines 45-46; page 5, lines 4-6; page 7, lines 20-47; examples 3 and 4	1-10,12,13	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)
Y	--- BECK J T ET AL: "BRIEF REPORT: ALLEVIATION OF SYSTEMIC MANIFESTATIONS OF CASTLEMAN'S DISEASE BY MONOCLONAL ANTI-INTERLEUKIN-6 ANTIBODY" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US, vol. 330, no. 9, 3 March 1994 (1994-03-03), pages 602-605, XP002937044 ISSN: 0028-4793 * the whole document *	1-14	C07K
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 10 July 2002	Examiner Renggli, J
<p>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</p> <p>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</p> <p>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons &amp; : member of the same patent family, corresponding document</p>			

2

EPO FORM 1503 03/82 (P04C04)





European Patent  
Office

SUPPLEMENTARY  
EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number  
EP 95 93 4866

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim
Y	EMILIE DOMINIQUE ET AL: "Administration of an anti-interleukin-6 monoclonal antibody to patients with acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: Effect on lymphoma growth and B clinical symptoms." BLOOD, vol. 84, no. 8, 15 October 1994 (1994-10-15), pages 2472-2479, XP001088120 ISSN: 0006-4971 * abstract *  -----	1-14
		CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.C1.6)
		TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.C1.6)
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.		
2	Place of search MUNICH	Date of completion of the search 10 July 2002
		Examiner Renggli, J
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document  T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ..... & : member of the same patent family, corresponding document		

EPO FORM 1503 03.82 (P04C04)



# ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.

EP 95 93 4866

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

10-07-2002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9219759	A	12-11-1992	JP	5227970 A	07-09-1993
			JP	5236966 A	17-09-1993
			AT	181575 T	15-07-1999
			AU	668349 B2	02-05-1996
			AU	1674092 A	21-12-1992
			AU	692100 B2	28-05-1998
			AU	5621396 A	24-10-1996
			DE	69229482 D1	29-07-1999
			DE	69229482 T2	18-11-1999
			DK	628639 T3	24-01-2000
			EP	0628639 A1	14-12-1994
			ES	2134212 T3	01-10-1999
			GR	3031174 T3	31-12-1999
			HU	70258 A2	28-09-1995
			WO	9219759 A1	12-11-1992
			JP	3176598 B2	18-06-2001
			JP	2000116391 A	25-04-2000
			JP	2001083151 A	30-03-2001
			KR	249937 B1	01-04-2000
			RU	2139351 C1	10-10-1999
			US	5795965 A	18-08-1998
			US	5817790 A	06-10-1998
			ZA	9203021 A	27-01-1993
EP 0409607	A	23-01-1991	AT	144713 T	15-11-1996
			CA	2021594 A1	21-01-1991
			DE	69029015 D1	05-12-1996
			DE	69029015 T2	22-01-1998
			EP	0409607 A2	23-01-1991
			ES	2093017 T3	16-12-1996
			HK	49497 A	25-04-1997
			JP	3139293 A	13-06-1991
			KR	214759 B1	02-08-1999
			KR	244579 B1	15-03-2000
			SG	42954 A1	17-10-1997
			US	5670373 A	23-09-1997
FR 2694767	A	18-02-1994	FR	2694767 A1	18-02-1994
EP 0413908	A	27-02-1991	IL	90488 A	28-10-1999
			DE	69028671 D1	31-10-1996
			DE	69028671 T2	20-02-1997
			EP	0413908 A2	27-02-1991
			JP	3157400 A	05-07-1991
			US	5621077 A	15-04-1997
			US	5216128 A	01-06-1993

EPO FORM P0459

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82





817 557

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP95/02169

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

03 July 1997 (03.07.97)

International application No.

PCT/JP95/02169

International filing date (day/month/year)

20 October 1995 (20.10.95)

Applicant

KISHIMOTO, Tadimitsu et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

\_\_\_\_\_ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Washington D.C. 20231  
United States of America

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 02 May 1996 (02.05.96)	
International application No.: PCT/JP95/02169 ✓	Applicant's or agent's file reference: C853-PCT
International filing date: 20 October 1995 (20.10.95)	Priority date: 21 October 1994 (21.10.94)
Applicant: KISHIMOTO, Tadimitsu et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:30 November 1995 (30.11.95)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election
- ☒
- was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 730.91.11
---	---



PCT



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>A61K 39/395</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO96/12503</b> <b>(43) 国際公開日</b> <b>1996年5月2日 (02.05.96)</b>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP95/02169</p> <p><b>(22) 国際出願日</b> 1995年10月20日 (20.10.95)</p> <p><b>(30) 優先権データ</b> 21 Apr 97 (30 mos.)  特願平6/257010 1994年10月21日 (21.10.94) JP.</p> <p><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b>  中外製薬株式会社  (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP]  〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p><b>(71) 出願人 ; および</b></p> <p><b>(72) 発明者</b>  岸本忠三(KISHIMOTO, Tadamitsu)[JP/JP]  〒584 大阪府富田林市中野町3-5-31 Osaka, (JP)</p> <p><b>(72) 発明者 ; および</b></p> <p><b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)</b>  勝目朝夫(KATSUME, Tomoo)[JP/JP]  斉藤浩之(SAITO, Hiroaki)[JP/JP]  〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地  中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p><b>(74) 代理人</b>  弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.)  〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号  虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p><b>(81) 指定国</b>  AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p style="text-align: right;">添付公開書類 <b>国際調査報告書</b></p> </div> </div>		
<p><b>(54) Title : REMEDY FOR DISEASES CAUSED BY IL-6 PRODUCTION</b></p> <p><b>(54) 発明の名称</b> IL-6産生に起因する疾患の治療剤</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>A preventive or remedy for diseases caused by interleukin-6 production, containing an antibody against interleukin-6 receptors (an IL-6R antibody). Examples of the antibody include antibodies of animals other than humans, such as mouse and rat, chimeric antibodies comprising the above antibodies and a human antibody, and a reconstituted human antibody. Examples of the diseases concerned include plasmacytosis, anti-IgG1-emia, anemia and nephritis.</p>		

(57) 要約

インターロイキン-6レセプターに対する抗体（IL-6R抗体）を含んで成る、インターロイキン-6の産生に起因する疾患の予防治療剤。IL-6R抗体としては、マウス、ラット等のヒト以外の動物の抗体、これらとヒト抗体とのキメラ抗体、再構成ヒト抗体等が使用できる。

IL-6産生に起因する疾患として、例えばプラズマサイトーシス、抗IgG1血症、貧血、腎炎等の予防・治療のために有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DE	ドイツ	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア共和国
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SK	スロバキア共和国
BR	ブラジル	GU	グアテマラ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	SZ	スワジランド
CA	カナダ	IE	アイアランド	ML	マリ	TD	チャド
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MN	モンゴル	TG	トゴ
CG	コンゴ	JP	日本	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CH	スイス	KE	ケニア	MW	モザンビーク	TM	トルクメニスタン
CI	コートジボワール	KG	キルギスタン	MX	メキシコ	TR	トルコ
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	TT	トリニダード・トバゴ
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
				NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
				PL	ポーランド		

## 明 細 書

## I L - 6 産生に起因する疾患の治療剤

## 技術分野

本発明はインターロイキン-6レセプター (I L - 6 R) に対する抗体 (抗 I L - 6 R 抗体) を含んで成る、インターロイキン-6 (I L - 6) の産生に起因する疾患の予防又は治療剤に対する。

## 背景技術

I L - 6 は多機能性を有するサイトカインで、免疫、血液、急性期反応等の様々な段階で作用し [Taga, T. ら、Critical Reviews i n Immunol. 1992;11:265-280.]、多発性骨髄種の増殖因子として作用するに加え種々の疾患、例えば、リウマチ [Hirano, T. ら、Eur J Immunol. 1988;18:1797-1801; Houssiau, F.A. ら Arth Rheum. 1988;31:784-788.] Castleman's disease [Yoshizaki, K. ら Blood 1989;74:1360-1367; Brant, S.J. ら J Clin Invest. 1990;86:592-599.] のようなプラズマサイトーシスがみられる病気、あるいはメサンギウム細胞増殖性腎炎 [Ohta, K. ら Clin Nephrol. (Germany) 1992;38:185-189; Fukatsu, A. ら Lab Invest. 1991;65:61-66; Horii, Y. ら J Immunol. 1989;143:3949-3955.]、腫瘍増殖に伴う悪液質 [Strassmann, G. ら J Clin Invest. 1992;89:1681-1684.] などでも重要な役割をはたしていると考えられている。

遺伝子操作によって human I L - 6 (h I L - 6) を過剰発現させた H - 2 L<sup>d</sup> h I L - 6 トランスジェニックマウス (I L - 6 T g m) では I g G 1 プラズマサイトーシス、メサンギウム増殖性腎炎、貧血、血小板減少症、自己抗体の出現などが観察され

〔宮井達也ら：第21回日本免疫学会発表「H-2L<sup>d</sup> hIL-6  
トランスジェニックマウスの加齢に伴う血液および血清学的変化」  
；1991〕、IL-6の多彩な疾患に対する関与が示唆された。

しかしながら、インターロイキン-6レセプターに対する抗体が、  
インターロイキンの生産に対する疾患に対して有効であることは  
知られていない。

#### 発明の開示

従って本発明は、インターロイキン-6の生産に起因する疾患の  
予防又は治療剤を提供しようとするものである。

上記の課題を解決するため、本発明はインターロイキン-6レセ  
プターに対する抗体を含んで成る、インターロイキン-6の生産に  
起因する疾患の予防又は治療剤を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、各群の動物の推移の体重の増加を示すグラフである。

図2は、各群の尿蛋白質の陽性率の推移を示すグラフである。1  
群及び3群以外の群では尿蛋白質の陽性率は0であった。

図3は、各群のヘモグロビンレベルの推移を示すグラフである。

図4は、各群の赤血球数の推移を示すグラフである。

図5は、各群の血小板数の推移を示すグラフである。

図6は、各群の白血球数の推移を示すグラフである。

図7は、各群の血清IgG1濃度の推移を示すグラフである。

図8は、1～5群でのヒトIL-6濃度の推移を示すグラフであ  
る。

図9は、1群及び2群における、対照抗体IgG及びGr-1抗  
体による、蛍光抗体セルソーティングの結果を示す図である。



図 10 は、6 群及び 7 群における、対照抗体 I g G 及び G r - 1 抗体による、蛍光抗体セルソーティングの結果を示す図である。

図 11 は、実験終了後の各群の動物の脾臓重量を示すグラフである。

図 12 は、各群の動物の体重の推移を示すグラフである。

図 13 は、実験 11 日目のマウスの血中トリグリセリド濃度を示すグラフである。

図 14 は、実験 15 日目のマウスの血中グルコース濃度を示すグラフである。

図 15 は、実験 11 日目のマウスの血中イオン化カルシウム濃度を示すグラフである。

図 16 は、担癌マウスの生存率を示すグラフである。

図 17 は、実験開始 10 および 12 日目のマウスの体重を示すグラフである。

図 18 は、実験開始 10 および 12 日目のマウスの血中イオン化カルシウム濃度を示すグラフである。

#### 具体的な説明

インターロイキン-6 の生産に起因する疾患としては、例えばプラズマサイトーシス、例えばリウマチ、キャスルマン病 (C a s t l e m a n ' s d i s e a s e) ; 高イムノグロブリン血症 ; 貧血 ; 腎炎、例えばメサングウム増殖性腎炎 ; 悪液質等が挙げられる。

本発明で使用される I L - 6 レセプター抗体は、I L - 6 によるシグナル伝達を遮断し、I L - 6 の生物学的活性を阻害するものであれば、その由来および種類 (モノクローナル、ポリクローナル) を問わないが、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。

。この抗体は I L - 6 R と結合することにより、I L - 6 と I L - 6 R の結合を阻害して、I L - 6 のシグナル伝達を遮断し、I L - 6 の生物学的活性を阻害する抗体である。

モノクローナル抗体の産生細胞の動物種は哺乳類であれば特に制限されず、ヒト抗体またはヒト以外の哺乳動物由来であってよい。ヒト以外の哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、その作成の簡便さからウサギあるいはげっ歯類由来のモノクローナル抗体が好ましい。げっ歯類としては、特に制限されないが、マウス、ラット、ハムスターなどが好ましく例示される。

このような I L - 6 レセプター抗体としては、M R 1 6 - 1 抗体 (Tamura, T. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 11924-11928, 1993)、P M - 1 抗体 (Hirata, Y. ら、J. Immunol. 143, 2900-2906, 1989) などが挙げられる。

モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作成できる。すなわち、I L - 6 R を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作成できる。

より具体的には、モノクローナル抗体を作成するには次のようにすればよい。例えば、前記感作抗原としては、欧州特許出願公開番号 E P 3 2 5 4 7 4 号に開示されたヒト I L - 6 R の遺伝子配列を用いることによって得られる。ヒト I L - 6 R の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的の I L - 6 R タンパク質を精製し、この精製 I L - 6 R タンパク質を感作抗原として用いればよい。

また、マウス由来の前記感作抗原としては、日本特許出願公開番号特開平 3 - 1 5 5 7 9 5 に開示されたマウス I L - 6 R の遺伝子配列を用い、上記ヒト I L - 6 R の遺伝子配列を用いたのと同様な方法にしたがえばよい。

I L - 6 R は細胞膜上に発現しているものの他に細胞膜より離脱している可能性のもの (s I L - 6 R) が抗原として使用できる。s I L - 6 R は細胞膜に結合している I L - 6 R の主に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型 I L - 6 R と異なっている。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物に腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を P B S ( P h o s p h a t e - B u f f e r e d S a l i n e ) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に 4 - 2 1 日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P 3 ( P 3 x 6 3 A g 8 . 6 5 3 ) (J. Immunol. 123:1548, 1978), p 3 - U 1

(Current Topics in Micro-biology and Immunology 81:1-7, 1978), NS-1 (Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976), MPC-11 (Cell, 8:405-415, 1976): SP2/0 (Nature, 276:269-270, 1978), FO (J. Immunol. Meth. 35:1-21, 1980), S194 (J. Exp. Med. 148:313-323, 1978), R210 (Nature, 277:131-133, 1979)等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Milsteinら、Methods Enzymol. 73:3-46, 1981)等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、その種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS)等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEG溶液を通常、30-60% (w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ)が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去で

きる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、H A T 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該H A T 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が行われる。

このようにして作成されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

さらに、前記の方法により得られるモノクローナル抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法等の通常の前製手段を利用して高純度に精製することができる。

このようにして、作成されるモノクローナル抗体は、放射免疫測定法（R I A）、酵素免疫測定法（E I A, E L I S A）、蛍光抗体法（I m m u n o f l u o r e s c e n c e   A n a l y s i s）等の通常の免疫学的手段により抗原を高感度かつ高精度で認識することを確認することができる。

本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体に限られるものではなく、ヒトに対する

異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変したものであってよい。例えば、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウスのモノクローナル抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域とからなるキメラ抗体を使用することができ、このようなキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法、特に遺伝子組換技法を用いて製造することができる。

さらに、再構成 (r e s h a p e d) したヒト抗体を本発明に用いることができる。これはヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域によりヒト抗体の相補性決定領域を置換したものであり、その一般的な遺伝子組換手法も知られている。その既知方法を用いて、本発明に有用な再構成ヒト型抗体を得ることができる。

なお、必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク (F R) 領域のアミノ酸を置換してもよい (Satoら、Cancer Res. 53:1-6, 1993)。このような再構成ヒト抗体としてヒト型化 P M - 1 (h P M - 1) 抗体が好ましく例示される (国際特許出願公開番号 W O 9 2 - 1 9 7 5 9 を参照)。

さらには抗原に結合し、I L - 6 の活性を阻害するかぎり抗体の断片、たとえば F a b あるいは F v, H 鎖と L 鎖の F v を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン F v (s c F v) をコードする遺伝子を構築し、これを適当な宿主細胞で発現させ、前述の目的に使用することができる。(例えば、Birdら、TIBTECH, 9:132-137, 1991; Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988 を参照)。さらに、s c F v を作成するために用いる H 鎖および L 鎖の F v には、上記再構成された抗体の V 領域を用いることができる。

本発明の I L - 6 レセプター抗体を有効成分とする I L - 6 の生産に起因する疾患の予防治療剤は、I L - 6 のシグナル伝達を遮断し、I L - 6 の生産に起因する疾患に有効である限り、本発明において使用することができる。

本発明の予防治療剤は、好ましくは非経口的に、たとえば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に投与することができる。さらに、少なくとも一種の医薬用担体または希釈剤とともに医薬組成物やキットの形態をとることができる。

本発明の予防治療剤のヒトに対する投与量は患者の病態、年齢あるいは投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、およそ 1 - 1 0 0 0 mg / 患者の範囲で 4 回以下の分割用量を選択することができる。また、1 - 1 0 mg / kg / 週の用量で投与することができる。しかしながら、本発明の予防治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

本発明の予防治療剤は常法にしたがって製剤化することができる。たとえば、注射用製剤は、精製された I L - 6 R 抗体を溶剤、たとえば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに、吸着防止剤、たとえば、T w e e n 8 0、ゼラチン、ヒト血清アルブミン (H S A) などを加えたものであり、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することができる。

## 実施例

以下、参考例および実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例 1. B 6 L<sup>d</sup> - I L - 6 トランスジェニックマウスの作製

H - 2 L<sup>d</sup> プロモーターと連結したヒト I L - 6 c D N A を含有する 3. 3 kbp の S p h I - X h o I 断片 (L<sup>d</sup> - I L - 6) (Suematsuら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 86, 7547, 1989) を、Yamamuraら、J.Biochem. 96, 357, 1984 に記載されている方法に従って C 5 7 B L / 6 J (B 6) マウス (日本クレア) からの受精卵の前核にマイクロインジェクションにより注入した。

その受精卵を、疑妊娠処置した雌性 I C R マウスの卵管内に移植した。その後、生まれたマウスについて、ヒト I L - 6 c D N A の組込みを E c o R I 消化した尾部 D N A のサザンブロット分析により、プローブとしてヒト I L - 6 c D N A の <sup>32</sup>P - 標識 T a q I - B a n I I 断片を用いてスクリーニングした。組込みが認められた個体と B 6 マウスを交配して同じ遺伝子型を持つマウスのラインを確立した。

参考例 2. ラット抗 I L - 6 R 抗体の調製

マウス可溶性 I L - 6 R 生産性 C H O 細胞を Saitoら、J.Immunol. 147, 168-173, 1991 に記載されているようにして調製した。この細胞を、5 % ウシ胎児血清 (F B S) を含有する  $\alpha$  M E M 中で 3 7 ° C にて、空气中 5 % C O<sub>2</sub> の加湿雰囲気下で培養した。馴化 (c o n d i t i o n e d) 培地を回収し、そしてマウス s I L - 6 R 調製物として使用した。培地中のマウス s I L - 6 R の濃度は、サンドイッチ E L I S A により、モノクローナル抗マウス I L - 6 R 抗体 R S 1 5 (Saito ら、J.Immunol. 147, 168-173, 1991) 及びラビットポリクローナル抗マウス I L - 6 R 抗体を用いて測定した。

マウス s I L - 6 R をマウス s I L - 6 R 調製物から、モノクローナル抗マウス I L - 6 R 抗体 (R S 1 2) を吸着させたアフィニティーカラムにより精製した。フロインドの完全アジュバント中 5



0  $\mu$ g の精製マウス s I L - 6 R により W i s t e r ラットを皮下注射免疫し、次に 2 週間後から 1 週間に 1 回、フロインドの不完全アジュバント中 5 0  $\mu$ g のマウス s I L - 6 R により 4 回皮下に追加免疫した。最後の追加免疫から 1 週間後、ラットに 1 0 0  $\mu$  l のリン酸緩衝液 (P B S) 中 5 0  $\mu$ g のマウス s I L - 6 R を静脈内投与した。

3 日後にラットより脾臓を摘出し、そしてポリエチレングリコール (ベーリンガーマンハイム) を用いて、ラットの脾細胞とマウス p 3 U 1 ミエローマ細胞とを 1 0 : 1 の比で融合処理した。9 6 - ウェルプレート (F a l c o n 3 0 7 5) のウェル中 3 7 °C にて、1 0 % F B S を含有する R P M I 1 6 4 0 培地 1 0 0  $\mu$  l 中で一夜インキュベートした後、ヒト I L - 6 を含有するヒポキサンチン / アミノプテリン / チミジン (H A T) 含有培地 1 0 0  $\mu$  l を各ウェルに添加した。4 日間にわたり毎日、培地の半分を H A T 培地により置換した。

7 日後、抗マウス s I L - 6 R を産生するハイブリドーマをマウス s I L - 6 R - 結合アッセイ (E L I S A) により選択した。要約すれば、ハイブリドーマの培養上清 1 0 0  $\mu$  l を 6 0 分間、ラビットポリクローナル抗 - ラット I g G 抗体を 1  $\mu$ g / ml でコートしたプレート中でインキュベートした。プレートを洗浄し、そして 1 0 0  $\mu$ g / ml のマウス s I L - 6 R と共にインキュベートした。洗浄後、ラビットポリクローナル抗 - マウス I L - 6 R 抗体を 2  $\mu$ g / ml で加え、そしてプレートを洗浄し、そしてアルカリ性ホスファターゼ - 結合ヤギポリクローナル抗 - ラビット I g G 抗体 (T a g o) と共に 6 0 分間インキュベートした。

最後に、洗浄後、プレートを、アルカリホスファターゼの基質 (S i g m a 1 0 4 ; p - ニトロフェニルホスフェート) と共にイ

ンキュベートし、そして405nmにてプレートリーダー（東ソー）を用いて読み取った。マウスsIL-6Rを認識するハイブリドーマを限界希釈法により2回クローニングした。腹水の作製のため、BALB/c nu/nuマウスに0.5mlのプリスタン（Pristan）を2回注射し、そして3日後に $3 \times 10^6$ 個の樹立されたハイブリドーマ細胞を腹腔内注射した。10～20日後に腹水を集め、そして腹水からプロテインGカラム（Oncogene Science）を用いてモノクローナル抗体MR16-1を精製した。

MR16-1により生産された抗体のIL-6に対する中和効果を、MH60.BSF2細胞（Matsuda ら、Eur. J. Immunol. 18:951-956, 1988）による $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みにより試験した。MH60.BSF2細胞を96-ウエルプレートに $1 \times 10^4$ 細胞/ $200 \mu\text{l}$ /ウエルの量で分配し、マウスIL-6（ $10 \text{ pg/ml}$ ）とMR16-1又はRS12抗体とをウエルに加え、そして細胞を $37^\circ\text{C}$ にて5%  $\text{CO}_2$  中で44時間培養した。次に、各ウエルに $^3\text{H}$ -チミジン（ $1 \text{ mCi/ウエル}$ ）を加え、4時間後に $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを測定した。

#### 実施例 1.

参考例1において作製したB6 IL-6トランスジェニックマウス（B6 IL-6 Tgm）を自家繁殖したヒトIL-6 cDNAを持つトランスジェニックマウス31匹及びヒトIL-6 cDNAを持たない正常同腹仔11匹（いずれも4週齢；雄性）を用いた。B6 IL-6 Tgmは6匹ずつ5群（第1～5群）に分け、第1群のみ7匹とした。また正常同腹仔に第6群5匹及び第7群6匹に分けた。

投与スケジュールは次の通りとした。

第1群（B6 IL-6 Tgm）：4週齢（実験第1日）にラ

ット I g G 1 抗体 (K H 5) (対照抗体) を 2 mg / 0. 2 ml 静脈内注射し、5 週齡 (実験第 8 日) 以降、週 2 回づつ (3 ないし、4 日毎) 1 0 0  $\mu$  g の K H 5 抗体を皮下注射した。

第 2 群 (B 6 I L - 6 T g m) : 4 週齡に M R 1 6 - 1 抗体を 2 mg / 0. 2 ml 静脈内注射し、5 週齡以後週 2 回づつ 1 0 0  $\mu$  g の M R 1 6 - 1 を皮下注射した。

第 3 群 (B 6 I L - 6 T g m) : 4 週齡にリン酸緩衝液 0. 2 ml を静脈内注射し、そして 5 週齡以降週 2 回づつ 1 0 0  $\mu$  g の M R 1 6 - 1 を皮下注射した。

第 4 群 (B 6 I L - 6 T g m) : 4 週齡に 2 mg / 0. 2 ml の M R 1 6 - 1 を静脈内注射し、そして 5 週齡以降 2 週間ごとに 4 0 0  $\mu$  g の M R 1 6 - 1 を皮下注射した。

第 5 群 (B 6 I L - 6 T g m) : 4 週齡に 2 mg / 0. 2 ml の M R 1 6 - 1 を静脈内注射し、そして 5 週齡以降 2 週間ごとに 1 mg の M R 1 6 - 1 を皮下注射した。

第 6 群 (B 6 同腹仔) : 4 週齡に対照抗体 K H 5 を 2 mg / 0. 2 ml 静脈内注射し、そして 5 週齡以降週 2 回づつ 1 0 0  $\mu$  g の K H 5 を皮下注射した。

第 7 群 (B 6 同腹仔) : 4 週齡に 2 mg / 0. 2 ml の M R 1 6 - 1 を静脈内注射し、そして 5 週齡以降週 2 回づつ 1 0 0  $\mu$  g の M R 1 6 - 1 を皮下投与した。

本発明において使用した試験方法は次の通りである。

体重および尿蛋白測定 : 毎週体重測定ならびに尿蛋白試験紙 (C o m b i s t i c s 三共) による尿蛋白測定を行った。尿蛋白は 3 + (1 0 0 - 3 0 0 mg / dl) 以上を陽性とした。

採血 : 実験開始時 (4 週齡) より隔週に眼窩静脈叢より採血を行い、実験終了時 (1 8 週齡) には後大静脈より全採血を行った。

血球数測定 : micro cell counter (Sysmex F-800) により、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、血小板数 (PLT) ならびにヘモグロビン量 (HGB) を測定した。また、実験終了時には一部の群 (1, 2, 6, 7 群) について血液塗抹標本を作製し、白血球分画を行って百分比を算出した。

血中 IgG1 濃度測定 : standard として myeloma protein を用いたマウス IgG1 特異的 ELISA で測定を行った。

血中 hIL-6 濃度測定 : hIL-6 特異的 ELISA で測定を行った。

血中抗ラット IgG 抗体価 (IgG class) 測定 : 投与抗体はマウスにとって異種抗体であるため投与抗体に対する抗体産生の有無をラット IgG を抗原とした ELISA で測定を行った。測定はラット抗体を投与された adult の IL-6 Tgm 血清を standard とし、ユニット化して表示した。

#### 血清生化学値の測定

実験終了時の 1, 2, 3, 6 および 7 群のマウスの血清について、総蛋白質 (TP)、アルブミン (Alb)、グルコース (Glu)、トリグリセライド (TG)、クレアチニン (CRE)、血中尿素窒素 (BUN)、カルシウム (Ca)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、グルタミン-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) およびグルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) の各値をオートアナライザー (COBAS FARA II, Roche 社) で測定した。

骨髄および脾細胞の FACS による解析 : 実験終了時に 1, 2, 6, 7 群各 1 匹ずつの骨髄ならびに脾細胞を採取し、FACS ca

n (ベクトン・ディッキンソン) による細胞表面抗原の解析を実施した。使用した抗体は各々 Gr-1 (骨髓細胞)、CD 4, CD 8, B 2 2 0 (脾細胞) に対する抗体 (ファーマンジェン社) である。

。

剖検：実験終了時に剖検を実施し、脾重量の測定ならびに主要臓器の肉眼的観察を行った。

#### 結果

体重：各群の体重推移を図 1 に示した。1 群および 3 群では体重増加が観察された。他の群には体重変化の違いは観察されなかった。

。

尿蛋白：1 群では 1 3 週齢より尿蛋白陽性個体が出現し (図 2)、剖検時までに 7 匹中 4 匹 (1 6 週齢で 2 匹、1 7 週齢で 2 匹) が死亡したが他の群では死亡例は観察されなかった。3 群でも実験終了時までに 6 例中 2 例で尿蛋白陽性個体が出現したが、それ以外の群では認められなかった。

血液学的所見：1 群では、ヘモグロビン量 (図 3) および赤血球数 (図 4) の減少が認められ、加齢とともにその程度は著しいものとなった。血小板数 (図 5) は一端増加したのち急激に減少した。3 群では、1 群よりやや遅れて同様の傾向が観察された。一方、2, 4, 5 群では何れの群においてもヘモグロビン量、赤血球数の減少、血小板数の増加およびそれに続く減少は認められなかった。末梢血塗抹による白血球分画の観察では、1 群で好中球および単球の増加、それにとともなうリンパ球比率の減少が認められたが 2 群はほぼ正常値を示した (表 1)。また、6 群と 7 群の間には有意な差は存在しなかった。

表 1

群		幼若好 中球	成熟好 中球	好酸球	好塩基球	単球	リンパ球	その他
1	平 均	2.00	31.33	1.33	0.00	9.33	56.00	0.00
	標準偏差	2.00	3.79	0.58	0.00	4.93	9.54	0.00
2	平 均	0.33	13.83	2.33	0.00	2.00	81.00	0.50
	標準偏差	0.52	4.17	1.03	0.00	2.28	4.82	0.55
	t 検 定	0.0676	0.0000	0.0557	-	0.0129	0.0006	0.0676
6	平 均	0.30	14.10	2.80	0.00	1.30	81.40	0.10
	標準偏差	0.45	4.60	0.91	0.00	1.04	4.08	0.22
7	平 均	0.42	10.67	2.42	0.08	0.58	85.75	0.08
	標準偏差	0.38	2.32	0.97	0.20	0.49	1.92	0.20
	t 検 定	0.6484	0.1406	0.5101	0.3816	0.1644	0.0427	0.8992

血中 I g G 1 濃度 : 1 群では、実験開始直後より著明な血中 I g G 1 濃度の上昇が観察され最終的には正常マウスの 1 0 0 倍程度の濃度に達した (図 7)。3 群は 1 群よりやや遅れて I g G 1 濃度の上昇が観察された。これに対し、2, 4, 5 群では I g G 1 濃度の上昇は観察されず、実験期間中ほぼ一定の濃度であった。また、正常マウスでは抗体投与にともなう変化は観察されなかった。

血中 h I L - 6 濃度 : 血中 h I L - 6 濃度 (図 8) は、I g G 1 と同様に推移し、1 群および 3 群で血中濃度の上昇が観察されたのに対し、他の群では実験期間中ほぼ一定であった。

血中抗ラット I g G 抗体価 : 1, 3 および 6 群ではラット I g G に対する抗体が検出された (表 2)。1 および 3 群では全例高い抗体価を示したが、6 群で抗体価が上昇していたのは 5 匹中 2 匹であった。一方、その他の群では有意の上昇は観察されなかった。

マウス抗ラット抗体 (ユニット/ml) 表 2

群No.	齢 (週)	4	6	8	10	12	14	16	18
1	0.15	0.78	1.69	7.41	100<	100<	100<	100<	100<
2	0.22	0.34	0.45	0.38	0.43	0.50	0.39	0.30	
3	0.14	0.61	0.69	0.67	2.27	4.74	14.25	41.24	
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.57
5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.28
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.55
7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.20

N.D. : 測定せず

血清生化学値の測定

1 群と 3 群は、TP の増加と A l b の減少が認められた。TG と ALP は、1 群と 3 群で低下し、1 群では G l u の低下もみられた。2 群ではこれらの変化はみられなかった。

表 3

群	TP(g/dl)	Alb(g/dl)	Glu(mg/dl)	TG(mg/dl)	CRE(mg/dl)	BUN(mg/dl)	Ca(mg/dl)	ALP(U/l)	GOT(IU/l)	GPT(U/l)
1 mean	14	2.41	77.4	20.7	0.4	34.8	8.6	27.67	33.33	6
SD	1.33	0.3	14.5	8.33	0.2	23.7	0.35	5.69	5.86	1.73
2 mean	5.68	3.31	199	62.3	0.51	28.3	8.67	156.5	37.5	5.6
SD	0.3	0.2	29.5	10.9	0.22	4.08	0.58	14.31	8.22	1.14
3 mean	12.6	2.92	253	41	0.61	26.4	9.82	54.17	27.33	6.83
SD	2.85	0.64	60.2	16.3	0.17	6.25	0.83	42.62	5.65	1.72
6 mean	5.9	3.84	289	105	0.87	27.9	8.9	181	33.2	9.6
SD	0.65	0.46	98.9	28.8	0.22	6.32	0.74	21.24	8.9	5.81
7 mean	5.86	3.63	300	94	0.75	26.8	8.98	196.83	34.5	6.5
SD	0.53	0.34	25.5	20	0.2	5.26	0.82	21.68	4.89	3.08



FACSによる解析：1，2，6，7群のFACSによる骨髓細胞（BM）および脾細胞（sp）の解析を行ったところ1群のBM細胞では顆粒球系前駆細胞であるGr-1陽性細胞の比率が極端に増加していた（図9、図10）が2群では同腹仔と同様の値を示した。また、6群と7群の間にはほとんど差がなかった。sp中のCD4，CD8，B220陽性細胞の比率は1群で形質細胞の増加によるCD8およびB220陽性細胞の減少が認められた以外は各群間に差は認められなかった（表4）。

表 4

## 脾細胞の表面抗原解析

群	CD 4 <sup>+</sup>	CD 8 <sup>+</sup>	B 2 2 0 <sup>+</sup>
1	1 3 . 2 %	5 . 4 %	2 3 . 1 %
2	1 8 . 5 %	1 4 . 3 %	5 0 . 0 %
6	1 9 . 9 %	1 5 . 0 %	5 3 . 1 %
7	1 3 . 9 %	1 0 . 6 %	5 7 . 3 %

剖検所見：1群および3群では、全身リンパ節の腫脹、脾臓の膨張が顕著であり（図11）、腎臓の退色も著明であった。一部、肝臓の腫大も観察された。これらの変化はその他の群では観察されず、2，4，5群は同腹仔とくらべて脾臓が軽度に腫脹している以外は著変はみられなかった。

次に、この実験の結果を説明する。コントロール抗体投与IL-6 Tgm（1群）では、IgG1プラズマサイトーシス、貧血、血小板増加、血小板減少、腎不全、血清生化学値の異常など多彩な病態が観察されたが、これらの発症をMR16-1はほぼ完全に抑制し得ることが明らかとなった。

IL-6はB細胞を形質細胞へ最終分化させることが知られてお

り〔Muraguchi, A. らJ Exp Med.1988;167:332-344. 〕、I L - 6 T g mはI L - 6 産生により、血中のI g G 1 濃度が上昇し、血清中のT P 値の増加およびA 1 b 値の低下がみられた。これらのことは、I g G 1 プラズマサイトーシスが発症したことを示している。

これに伴い、全身のリンパ節や脾臓などのリンパ系組織が著明に腫大することが、1 および 3 群で病状進行により全身状態が悪化しているにも関わらず体重増加が観察された原因であろう。M R 1 6 - 1 はこれらの症状を完全に抑制すると同時に血中I L - 6 濃度の増加も抑制した。したがって、I L - 6 T g mで認められる加齢に伴う血中I L - 6 濃度の増加はプラズマサイトーシスの進行と直接関係していることが確認された。すなわち、増殖した形質細胞自身がI L - 6 を盛んに産生することによってさらに形質細胞が増殖し、結果的にI L - 6 が大量に産生されることにあると考えられた。

I L - 6 の血液系に対する作用としては、血小板増加作用〔Ishibashi, T. らProc Natl Acad Sci USA 1989;86:5953-5957; Ishibashi, T. らBlood 1989;74:1241-1244. 〕や小球性貧血を引き起こす作用〔Hawley, R.G. らJ Exp Med.1992;176:1149-1163. 〕が知られている。I L - 6 T g mではこれらに加えて多クローン性B細胞活性化(p o l y c l o n a l B c e l l a c t i v a t i o n) 進行に関連した自己免疫性と考えられる〔宮井達也ら、前掲〕、加齢に伴う血小板減少が観察される。

M R 1 6 - 1 はこのようなI L - 6 の直接および間接的な血球系に対する作用を完全に抑制したが同腹仔の血球数には影響しなかった。したがって、正常状態において抗I L - 6 レセプター抗体は血球系になんら影響を及ぼさないことが確認できた。また、I L - 6

T g mでは骨髄中の顆粒球系前駆細胞と考えられるG r - 1陽性細胞比率の増加および末梢好中球比率の増加が観察された。I L - 6が好中球を増加させることは知られているもののその詳細な機序は未だ明らかになっていない。今回の検討でこの作用が骨髄の前駆細胞レベルですでに起こっている現象であることが判明した。ここでもMR 1 6 - 1はI L - 6の作用を完全に抑制し、骨髄と末梢血中の好中球レベルには影響を与えなかった。

MR 1 6 - 1はI L - 6 T g mで観察される腎炎の発症も抑制した。I L - 6はメサングウム細胞のオートクライン増殖因子としてメサングウム増殖性腎炎の発症に密接に関与していると報告されており、I L - 6 T g mの腎炎も組織学的にメサングウム増殖性腎炎であることが確認されているが、I L - 6によって亢進された免疫系の関与も否定できない〔勝目朝夫ら：第21回日本免疫学会発表「SCID×(SCID×H-2L<sup>d</sup>h)IL-6 transgenic mouse)マウスの特性」；1991〕。いずれにしても今回の実験で尿蛋白出現および腎炎による死亡の抑制がみられたことから、I L - 6産生に起因する腎炎発症の抑制に抗I L - 6レセプター抗体が有効であることが明らかとなった。

I L - 6 T g mでは、悪液質の指標である血清中G l u値とT g値の著しい低下が観察された。今回の実験では、1群ではG l u値とT g値が低下し、2群ではこれらの値がほぼ正常と同程度に回復したことから、MR 1 6 - 1抗体の投与が悪液質の改善に効果があることが示された。

MR 1 6 - 1はラットI g G 1で、マウスにとっては異種蛋白であるため投与抗体に対する抗体が産生され投与抗体が無効になることが容易に想像される。

今回の実験では初回感作時に大量の抗原に暴露されることによっ

て免疫学的寛容が誘導されることを期待して初回に 2 mg / m o u s e の抗体を静脈内投与した群を設定した。MR 1 6 - 1 投与群の内この処置を施した群（2, 4, 5 群）では投与間隔、投与量に関係なく抗ラット I g G 抗体は検出されず、完全な発症抑制効果が観察されたが、3 群は抗ラット I g G 抗体が上昇しコントロール抗体投与群である 1 群よりやや発症が遅れたのみで結局は同様の病態を呈した。

したがって、この処置が免疫学的寛容誘導に有効であったと考えられるが、抗ラット I g G 抗体は同様のスケジュールでコントロール抗体を投与した 1 群の全例および 6 群の 2 / 5 例でも検出された。I L - 6 T g m はプラズマサイトーシスが進行すると p o l y c l o n a l B c e l l a c t i v a t i o n が起こるため、1 群および 3 群で検出された抗ラット I g G 抗体が投与抗体特異的抗体であると断定はできないが、2, 4, 5 群では初回感作時に大量の抗原に暴露されたことによる免疫学的寛容誘導効果と大量の MR 1 6 - 1 投与による特異抗体産生抑制作用〔斉藤浩之ら、前掲〕とが相まって完全な寛容が誘導されたのではないかと考えられた。

今回の実験で、抗 I L - 6 レセプター抗体が正常レベルには影響を与えずに I L - 6 産生に起因する種々の疾患に対して極めて有効であることが明らかとなった。

#### 実施例 2.

c o l o n 2 6 誘導悪液質モデルに対するマウス I L - 6 レセプター抗体の効果を検討した。マウスは 6 週齢の雄性 B A L B / c を用い、実験開始日に c o l o n 2 6 の 2 mm 角のブロックをマウスの側腹部皮下に移植した。マウス I L - 6 レセプター抗体 MR 1 6 - 1（参考例 2 参照）は、実験開始日の c o l o n 2 6 移植直

前に 2 mg/マウスを静脈内投与し、それ以降 7, 11, 14, 18 日目に 0.5 mg/マウスを皮下投与した (n = 7)。この方法では、異種蛋白のラット抗体に対する中和抗体が出現しづらいことを以前の実験で確認している。なお、担癌コントロール群には、ラット IgG1 コントロール抗体 (KH5) を同様のスケジュールで投与した (n = 7)。また、非担癌コントロール群として PBS 投与群を設置した (n = 7)。実験開始後、連日体重を測定し、実験開始 11 および 15 日目に血清生化学的値および血中イオン化カルシウム濃度を測定した。

担癌コントロール群では、10 日目以降、非担癌コントロール群に比べ著明な体重減少が観られたが、MR16-1 投与群では部分的な体重減少抑制効果を示した (図 12)。11 日目の血中トリグリセリド濃度および 15 日目の血中グルコース濃度を各々、図 13、図 14 に示す。これらの値は担癌コントロール群では非担癌コントロール群に比べ顕著に減少したが、MR16-1 投与群では、グルコースについては抑制傾向が、トリグリセリドについては有意な抑制効果が観察された。

11 日目の血中イオン化カルシウム濃度は、担癌コントロール群で非担癌コントロール群に比べ顕著に上昇したが、MR16-1 投与群では有意な抑制効果を示した (図 15)。

上記実験と同様のスケジュールで延命効果を確認する実験を行った (n = 10)。その結果、MR16-1 投与群では、延命効果があることが認められた (図 16)。

### 実施例 3.

高カルシウム血症を伴う o c c - 1 誘導悪液質モデルに対する IL-6 レセプター抗体の効果を検討した。マウスは、6 週齢の雄性ヌードマウスを用い、実験開始日にヒト口腔底癌細胞株 o c c - 1

をマウスの側腹部皮下に移植した。マウス IL-6 レセプター抗体 MR 16-1 (参考例 2 参照) は、実験開始日の o c c-1 移植直前に 2 mg/マウスを静脈内投与し、それ以降 7 および 10 日目に 100  $\mu$ g/マウスを皮下投与した (n = 6)。この方法では、異種蛋白のラット抗体に対する中和抗体が出現しづらいことを以前の実験で確認している。なお、担癌コントロール群には、ラット Ig G 1 コントロール抗体 (KH 5) を同様のスケジュールで投与した (n = 6)。また、非担癌コントロール群として P B S 投与群を設置した (n = 7)。実験開始 10 および 12 日目に体重および血中イオン化カルシウム濃度を測定した。

担癌コントロール群では、体重減少が観察されたが、MR 16-1 投与群では非担癌コントロール群と同様の体重の推移を示し、体重減少が抑制された (図 17)。

血中イオン化カルシウム濃度は、担癌コントロール群で非担癌コントロール群に比べ著明な上昇が認められたが、MR 16-1 投与群では上昇が強く抑制された (図 18)。

## 請 求 の 範 囲

1. インターロイキン-6レセプターに対する抗体を含んでなる、インターロイキン-6の産生に起因する疾患の予防または治療剤。
2. 前記インターロイキン-6の産生に起因する疾患がプラズマサイトーシスである、請求項1に記載の予防または治療剤。
3. 前記インターロイキン-6の産生に起因する疾患が高イムノグロブリン血症である、請求項1に記載の予防または治療剤。
4. 前記インターロイキン-6の産生に起因する疾患が貧血である、請求項1に記載の予防または治療剤。
5. 前記インターロイキン-6の産生に起因する疾患が腎炎である、請求項1に記載の予防または治療剤。
6. 前記インターロイキン-6の産生に起因する疾患が悪液質である、請求項1に記載の予防または治療剤。
7. 前記プラズマサイトーシスがリウマチにより惹起される、請求項2に記載の予防または治療剤。
8. 前記プラズマサイトーシスがキャッスルマン病により惹起される、請求項2に記載の予防または治療剤。
9. 前記腎炎がメサングウム増殖性腎炎である、請求項5に記載の予防または治療剤。
10. 前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1ないし9のいずれか一項に記載の予防または治療剤。
11. 前記抗体が、PM-1抗体である、請求項10に記載の予防または治療剤。
12. 前記抗体が、キメラ抗体である、請求項10に記載の予防または治療剤。

13. 前記抗体が、再構成ヒト抗体である、請求項 10 に記載の予防または治療剤。

14. 前記抗体が、再構成ヒト PM-1 抗体である、請求項 13 に記載の予防または治療剤。



Fig.1

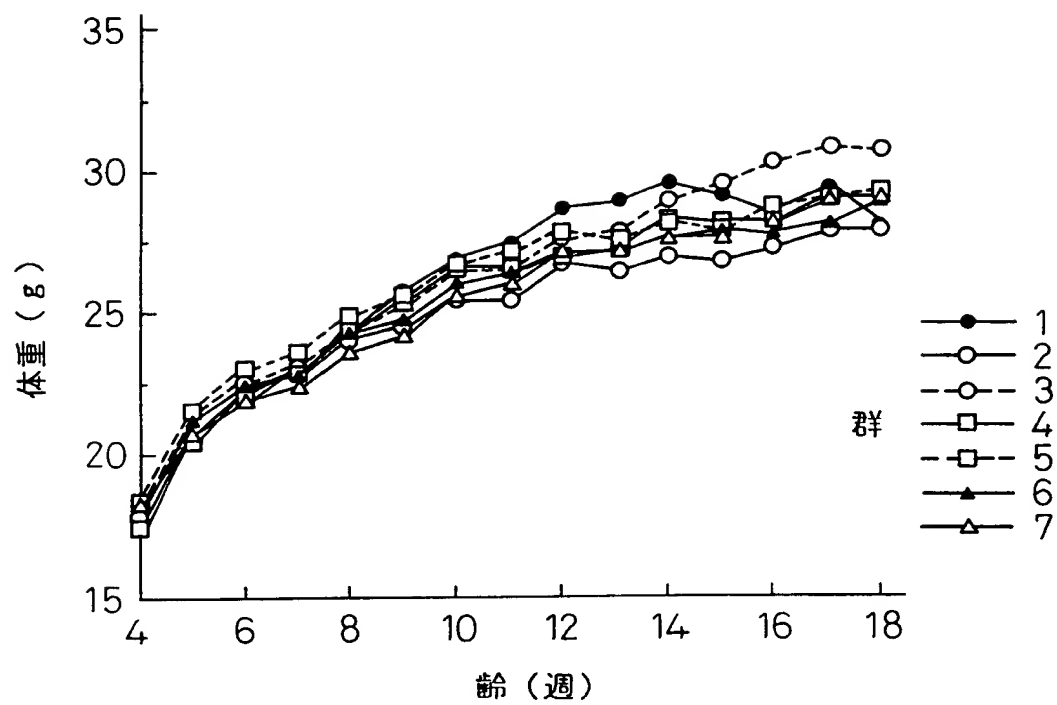




Fig. 2

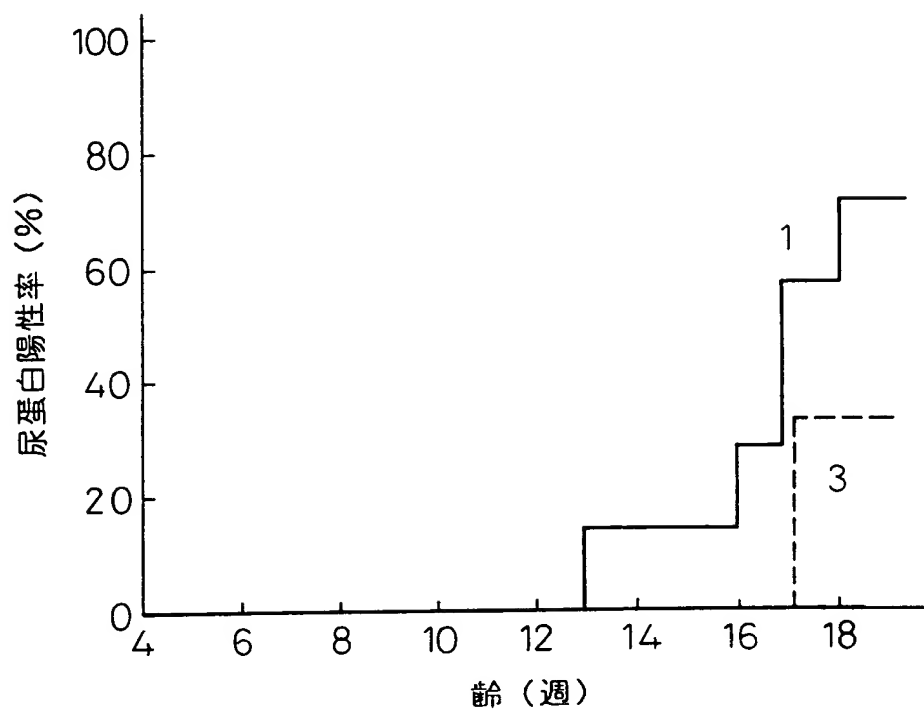




Fig.3

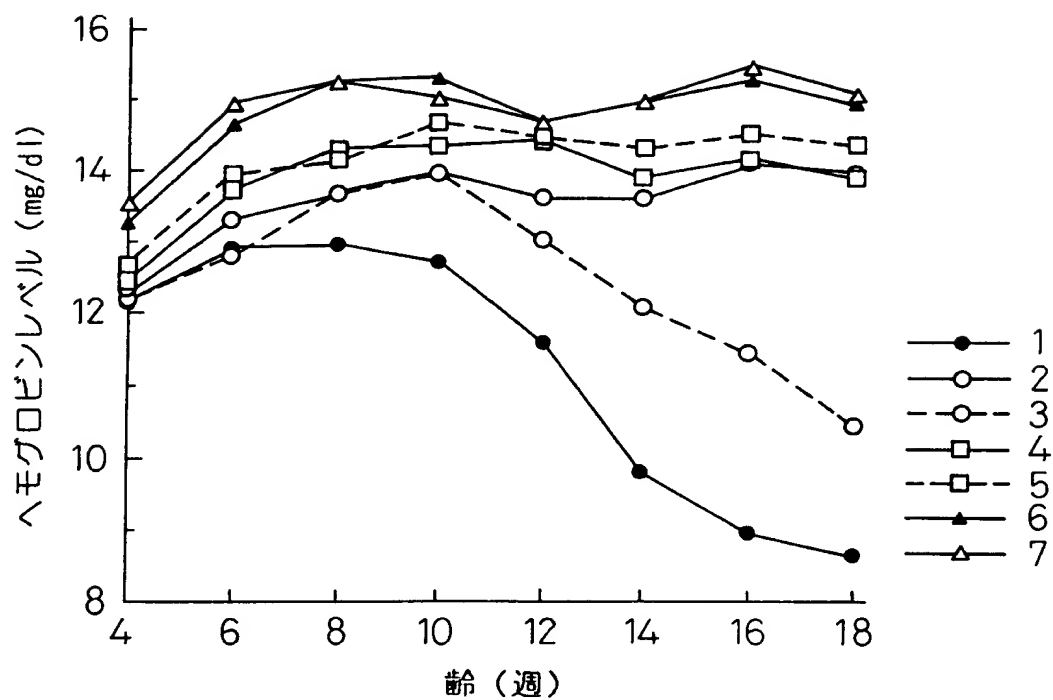




Fig. 4

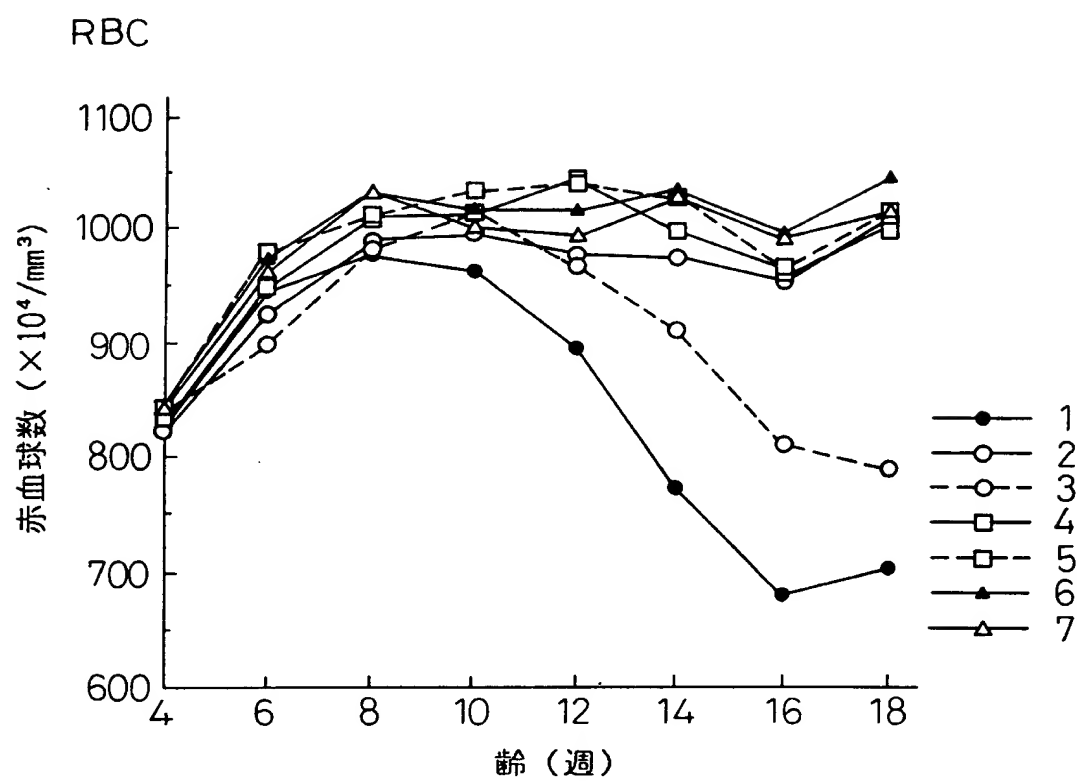






Fig. 5

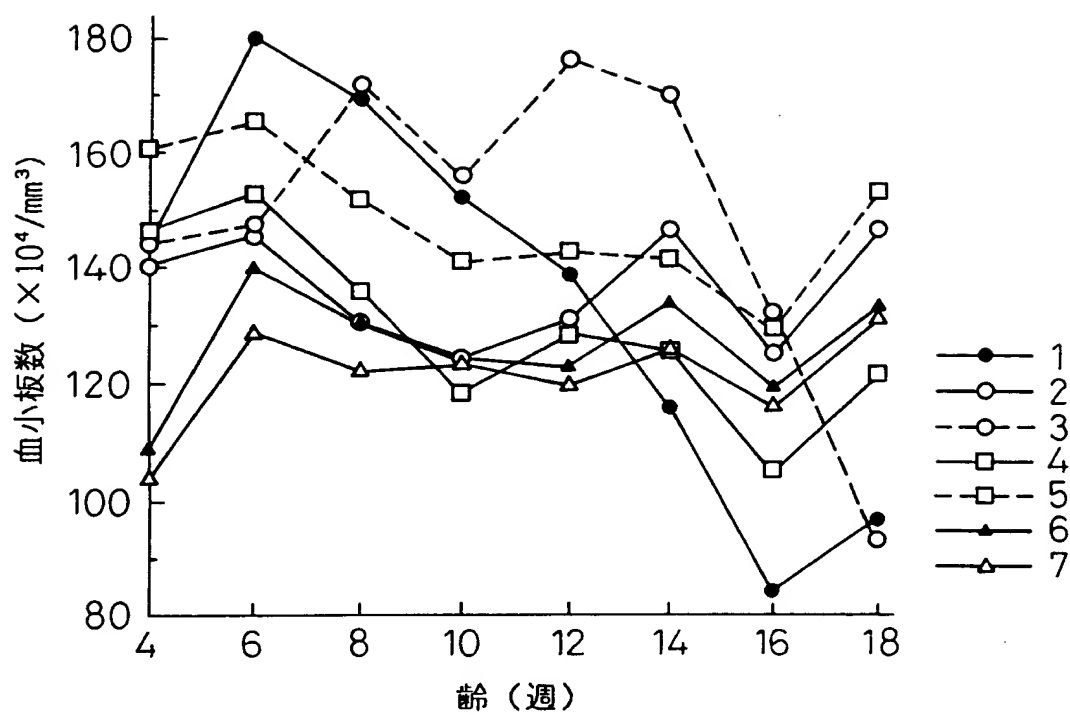




Fig .6

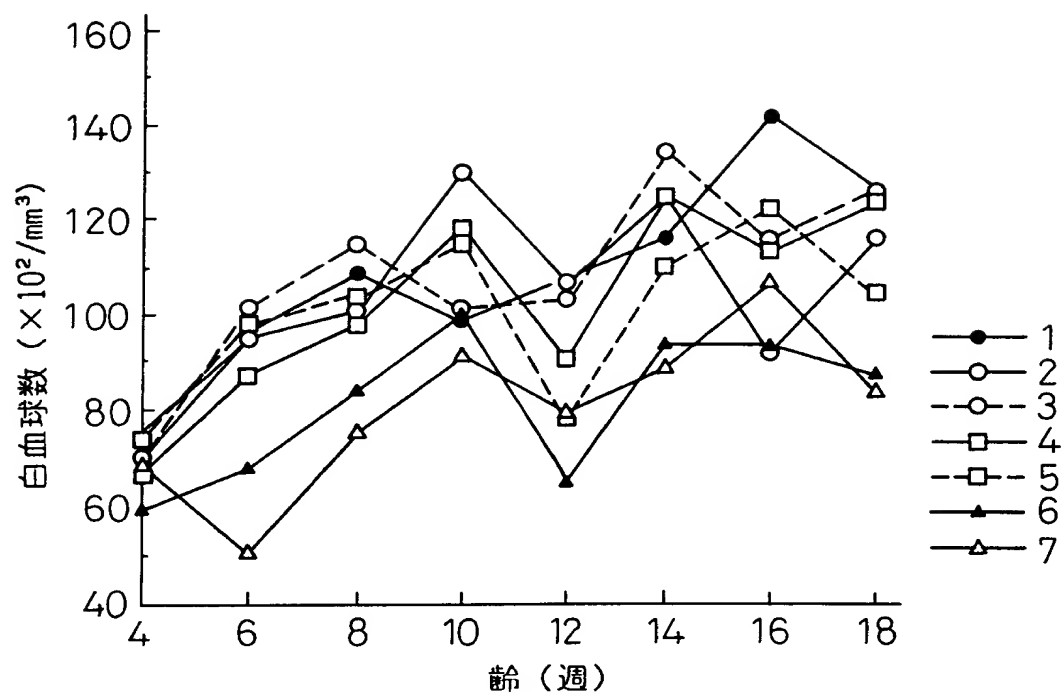




Fig.7

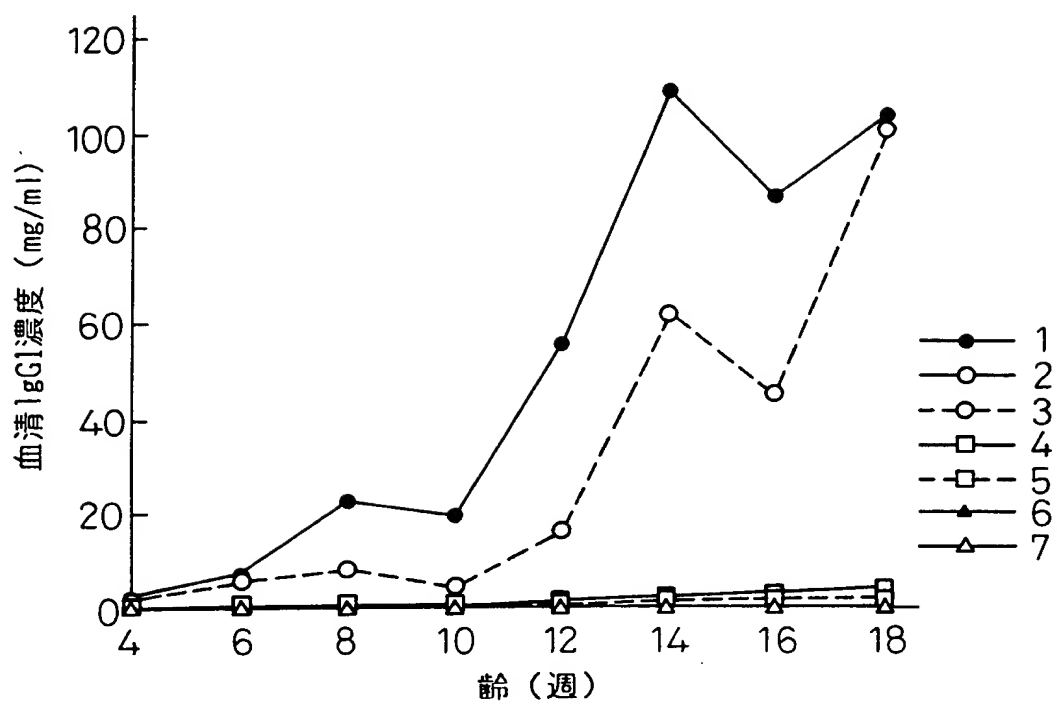




Fig. 8

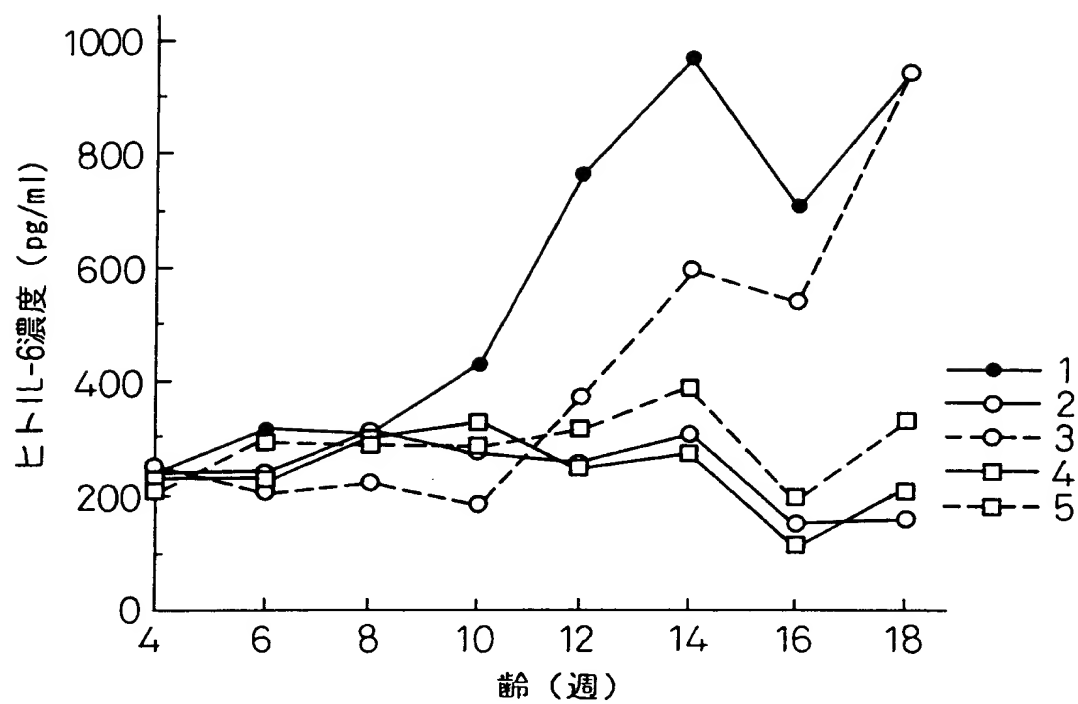






Fig. 9

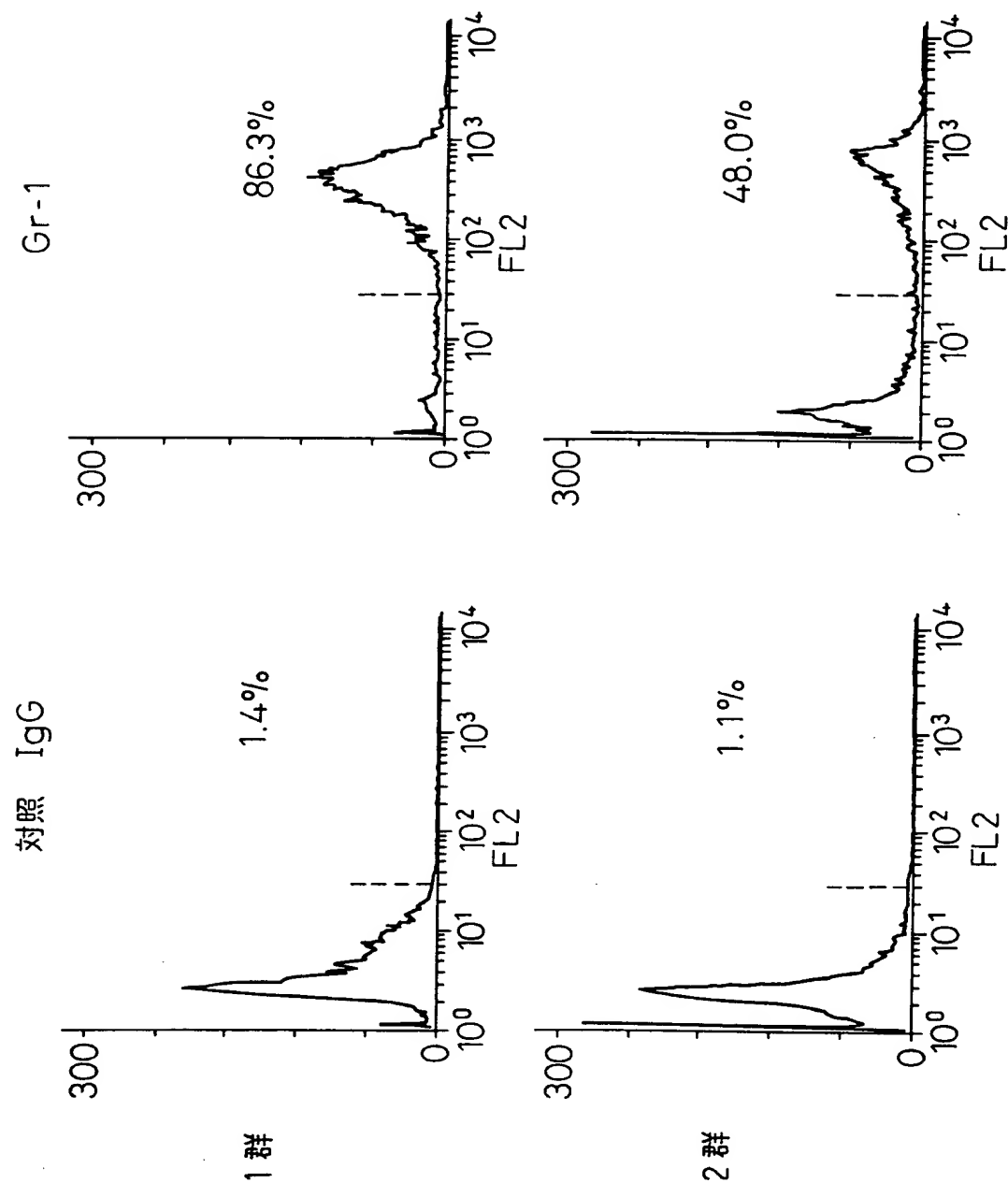




Fig. 10

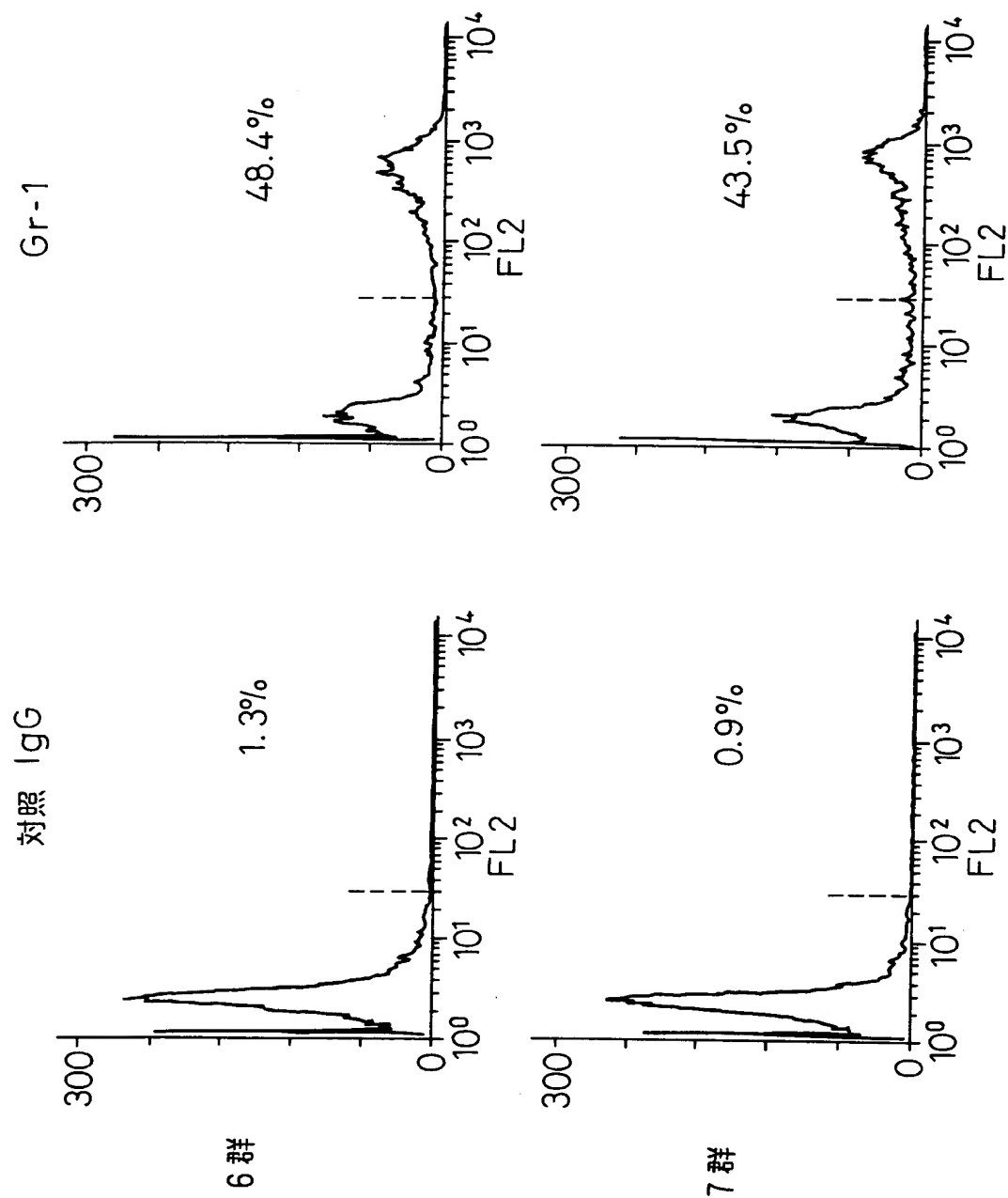
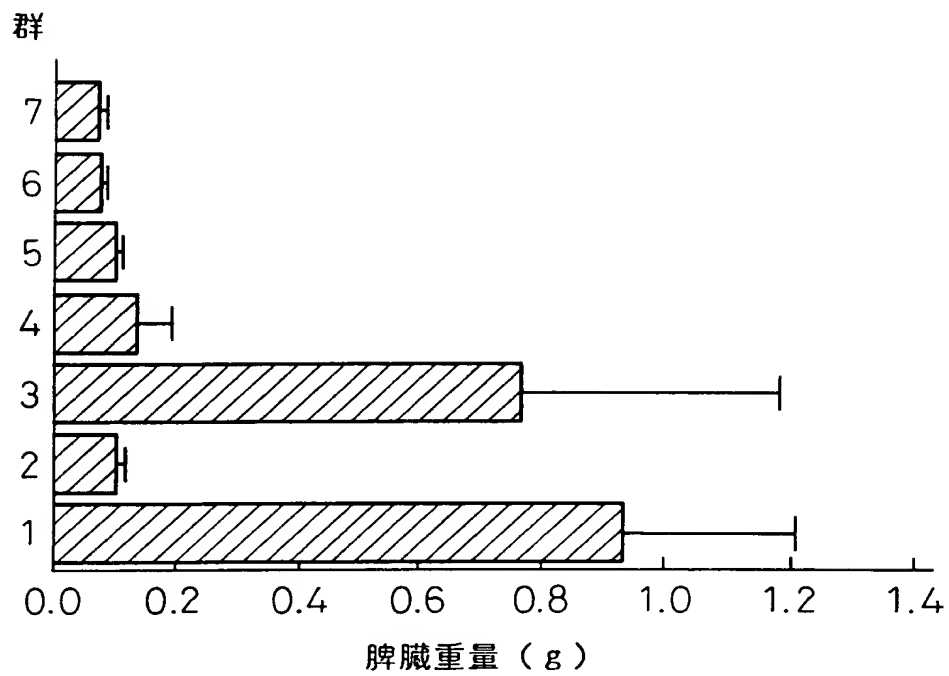




Fig. 11





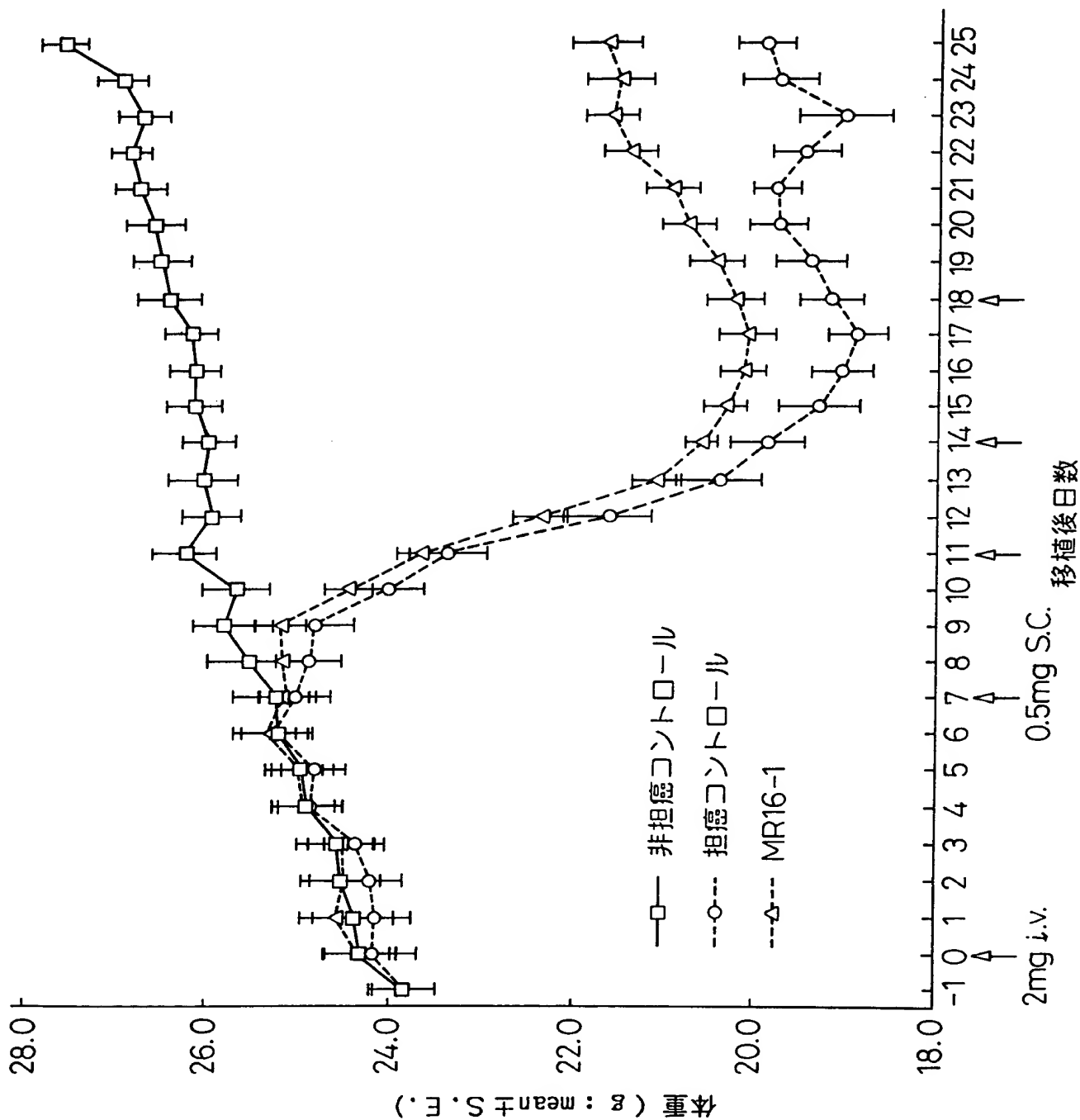






Fig.13

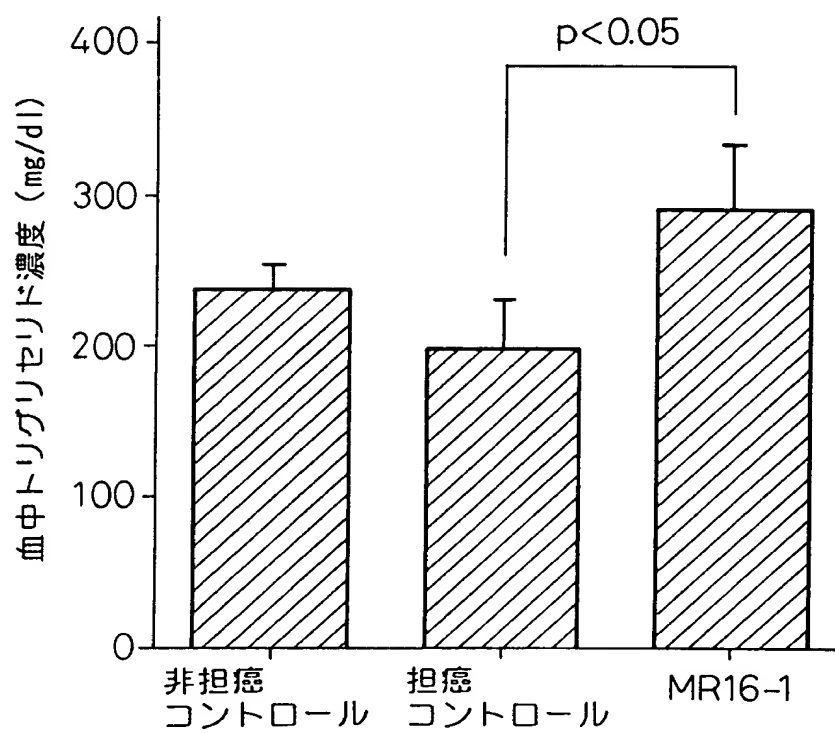




Fig.14

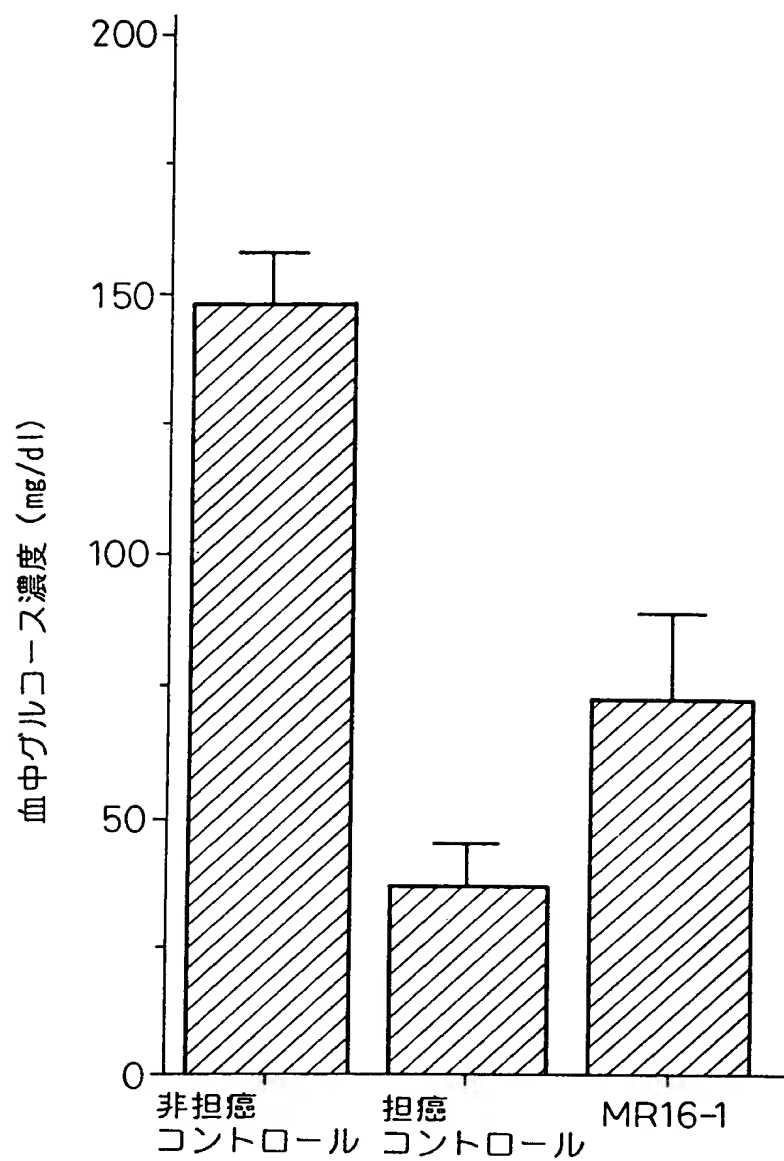




Fig. 15

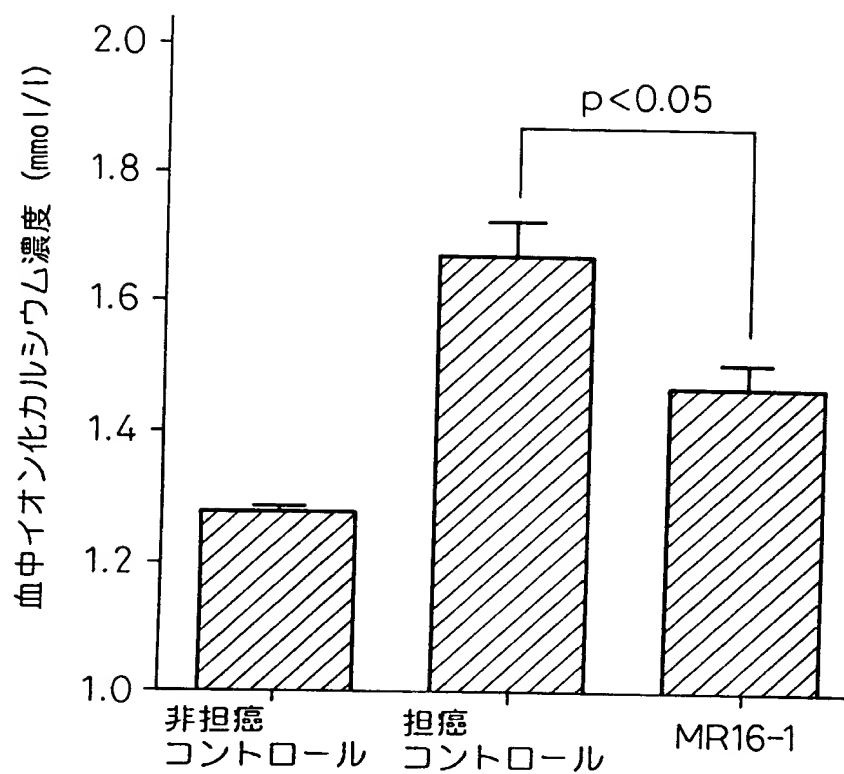




Fig.16

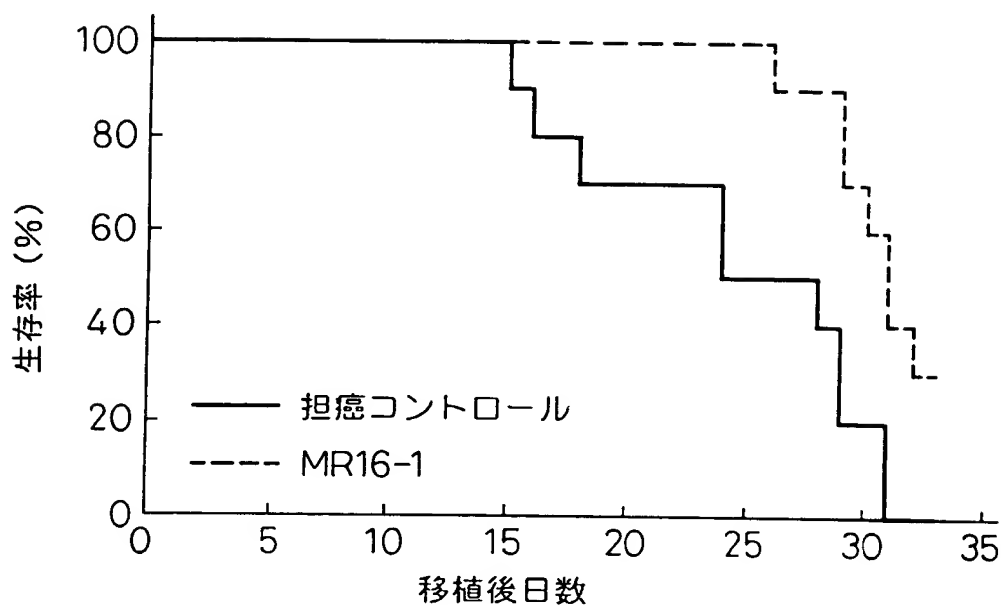






Fig.17

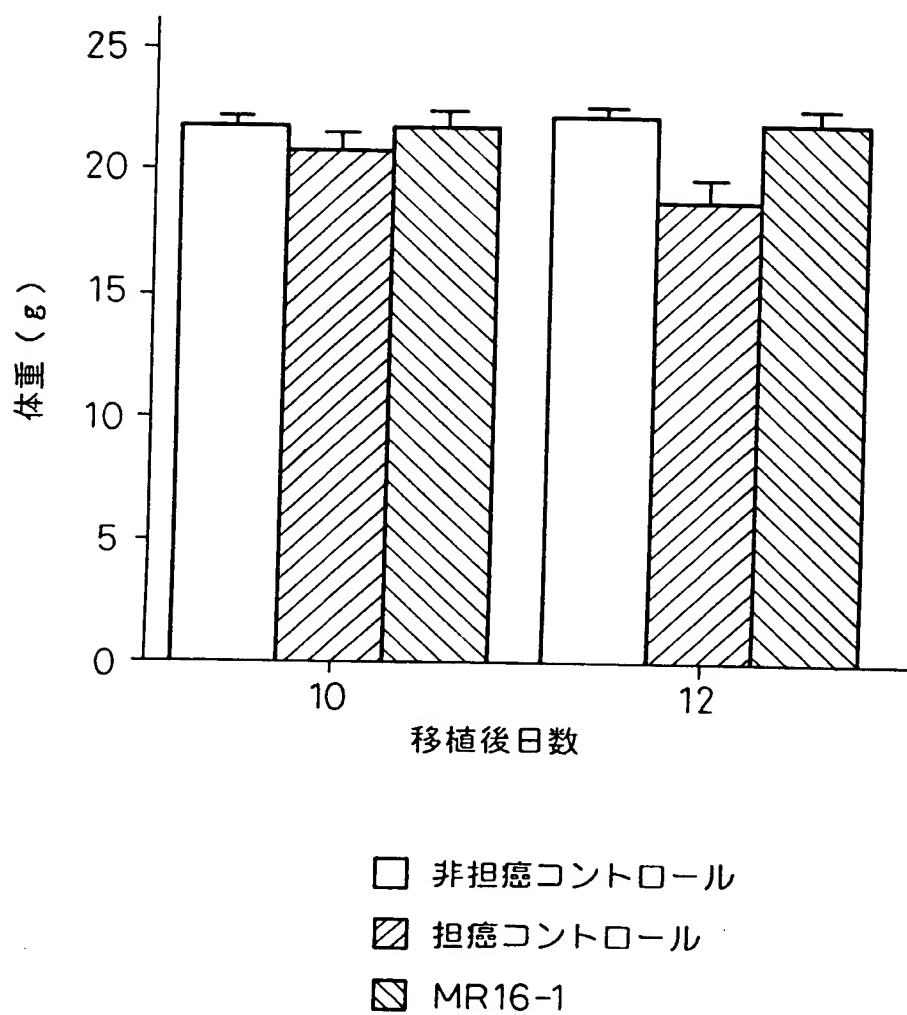
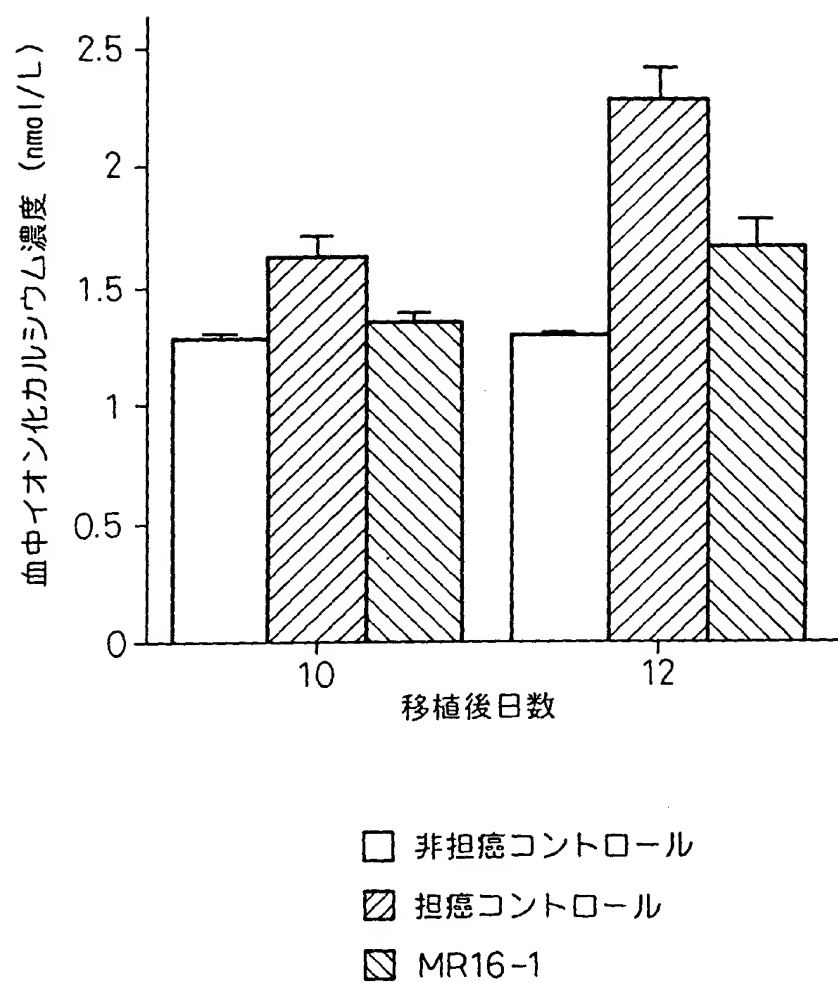




Fig.18





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02169

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C16 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C16 A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 3-139293, A (Chuzo Kishimoto), June 13, 1991 (13. 06. 91), Claim, lines 9 to 12, lower right column, page 6 (Family: none)	1-11, 14
Y	JP, 3-157400, A (Yeda Research and Development Co., Ltd.), July 5, 1991 (05. 07. 91), Claim, line 20, upper right column to line 9, lower left column, page 8 & EP, 413908, A	1-10, 12
Y	JP, 3-155795, A (Chuzo Kishimoto), July 3, 1991 (03. 07. 91), Claim, line 11, lower left column to line 4, lower right column, page 3 (Family: none)	1 - 9
Y	WO, 92/19759, A2 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), November 12, 1992 (12. 11. 92), Claim, line 18, page 1 to line 25, page 4 & EP, 628639, A	1 - 10, 12 - 14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 6, 1995 (06. 12. 95)

Date of mailing of the international search report

January 16, 1996 (16. 01. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A 61 K 39 / 395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A 61 K 39 / 395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 3-139293, A (岸本 忠三), 13. 6月. 1991 (13. 06. 91), クレーム及び第6頁右下欄第9行-12行 (ファミリーなし)	1-11, 14
Y	JP, 3-157400, A (イエダ リサーチ アンド デベロッ プメント カンパニー リミテッド), 5. 7月. 1991 (05. 07. 91), クレーム及び第8頁右上欄第20行-左下欄第9行 & EP, 413908, A	1-10, 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
(理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日  
の後に公表された文献「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と  
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため  
に引用するもの「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規  
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文  
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性  
がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 12. 95

国際調査報告の発送日

16.01.96

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松 浦 新 司

4 0 9 4 5 4

電話番号 03-3581-1101 内線

3 4 5 4

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 3-155795, A (岸本 忠三), 3. 7月. 1991 (03. 07. 91), クレーム及び第3頁左下欄第11行-右下欄第4行 (ファミリーなし)	1-9
Y	WO, 92/19759, A2 (中外製薬株式会社), 12. 11月. 1992 (12. 11. 92), クレーム及び第1頁第18行-第4頁第25行 & EP, 628639, A	1-10, 12-14



EP

US

## 特許協力条約

PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号	C 8 5 3 - P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知（様式PCT/ISA/220） 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP 9 5 / 0 2 1 6 9	国際出願日 (日.月.年) 2 0 . 1 0 . 9 5	優先日 (日.月.年) 2 1 . 1 0 . 9 4	
出願人（氏名又は名称） 岸 本 忠 三			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（PCT18条）の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない（第I欄参照）。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している（第II欄参照）。

3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条（PCT規則38.2(b)）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第    図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。 ☒ なし



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K39/395

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 3-139293, A (岸本 忠三), 13. 6月. 1991 (13. 06. 91), クレーム及び第6頁右下欄第9行-12行 (ファミリーなし)	1-11, 14
Y	JP, 3-157400, A (イエダ リサーチ アンド デベロツ ブメント カンパニー リミテッド), 5. 7月. 1991 (05. 07. 91), クレーム及び第8頁右上欄第20行-左下欄第9行 & EP, 413908, A	1-10, 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
(理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日  
の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と  
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため  
に引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規  
性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文  
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性  
がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 12. 95

国際調査報告の発送日

16.01.96

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松 浦 新 司



4 C 9 4 5 4

電話番号 03-3581-1101 内線

3454



C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 3-155795, A (岸本 忠三), 3. 7月. 1991 (03. 07. 91), クレーム及び第3頁左下欄第11行-右下欄第4行 (ファミリーなし)	1-9
Y	WO, 92/19759, A2 (中外製薬株式会社), 12. 11月. 1992 (12. 11. 92), クレーム及び第1頁第18行-第4頁第25行 & EP, 628639, A	1-10, 12-14



〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

### 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

岸本 忠三

寄託者

あて名

Ⓔ 584

殿

大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

#### I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

PM1

(受託番号)

微生物研究第 2998 号

(FERM BP- 2998)

#### II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質

☒ 分類学上の位置

#### III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 元年 7月12日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

(平成 元年 7月12日に寄託された微生物研究第 P- 10839 号より移管)

#### IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

Agency



Research Institute

Science and Technology

所長 鈴木智

Tomoo

DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号 305)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken

305. JAPAN

平成 2年 (1990) 7月 10日

